

· 论 著 ·

风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者 Treg 及 IL-6、IL-10、TGF- β 1 的变化分析

马星星, 薛 云, 张义和

(延安大学附属医院心脏外科, 陕西延安 716000)

摘 要:目的 探讨风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者的血清浓度以及白细胞介素(IL)-6、IL-10、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的变化分析。方法 选取 2013 年 4 月至 2014 年 6 月在该院接受治疗的 45 例风湿性心脏病患者为观察组以及本院体检中心的 45 例健康体检者为对照组作为本次的研究对象。观察两组受试者外周血 Treg 细胞的变化情况、血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 以及二尖瓣置换组织的 mRNA 表达水平。结果 术后, 观察组风湿性心脏病患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)/CD4⁺ T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺ 细胞/淋巴细胞的所占比例明显低于对照组($P<0.05$); 观察组患者外周血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 水平均低于对照组($P<0.05$); 观察组患者的二尖瓣 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2(表达水平平均高于对照组($P<0.05$)). 结论 风湿性心脏病二尖瓣置换术后患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞水平明显的下降, 血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 也相应地出现下降的现象。

关键词:风湿性心脏病; 血清浓度; 转化生长因子; 白细胞介素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.18.022 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)18-2613-03

Serum IL-6, IL-10 and TGF- β 1 concentrations and Treg changes before and after mitral valve replacement in patients with rheumatic heart disease

MA Xingxing, XUE Yun, ZHANG Yihe

(Department of Cardiac Surgery, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the serum IL-6, IL-10 and TGF- β 1 concentrations and changes before and after mitral valve replacement in the patients with rheumatic heart disease. **Methods** Forty-five cases of rheumatic heart disease in our hospital from April 2013 to June 2014 as the observation group and 45 individuals undergoing the healthy physical examination as the control group were selected as the research subjects. The changes of peripheral blood regulatory T cells, serum IL-6, IL-10 and TGF- β 1 levels were observed in the two groups. The mRNA expression level in the mitral valve replacement group was observed. **Results** The proportions of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ Treg/CD4⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺ cells/lymphocytes in the observation group were significantly lower than those in the control group respectively, the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.05$); peripheral serum IL-6, IL-10 and TGF- β 1 levels in the observation group were lower than those in the control group, the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.05$); the mitral MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 expression level in the observation group were significantly higher than those in the control group, the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Peripheral blood CD4⁺CD25⁺ Treg/CD4⁺ T cell level after mitral valve replacement in patients with rheumatic heart disease is significantly decreased, moreover serum IL-6, IL-10 and TGF- β 1 concentrations also appear a corresponding decline phenomenon.

Key words: rheumatic heart disease; serum concentration; TGF- β 1; interleukin

风湿性心脏病是一种自身免疫性疾病, 而变态反应性的心脏病是一种由于患者急性猩红热或者是风湿热等链球菌被感染所导致的, 是风湿热后遗症^[1]。该疾病的病理机制原因多种多样。但是却主要体现在患者的瓣膜口关闭或者是不全导致出现弥漫性纤维化的现象。该疾病若未得到及时有效的治疗, 往往会导致慢性心力衰竭^[2]。据调查在我国, 风湿性心脏病以及严重的威胁到了人们的生活水平以及身体健康。有大量的研究表明, 风湿性心脏病会对人体自身的抵抗力以及人体的心肌、心外膜、心内膜等起重大反应, 并且人体的链球菌被感染之后会引起患者自身的免疫反应, 最终导致病变。二尖瓣置换手术能够对患者所激发的炎性反应影响患者心肌缺血, 可以防止患者的心肌缺血^[3-4]。所以本研究旨在研究风湿性心脏病患者外周血中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、白细胞介素(IL)-6、IL-10、CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)/CD4⁺ T 细胞以及 CD4⁺

CD25⁺ 细胞/淋巴细胞的检测以及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP-2)的表达水平, 研究其变化情况, 为临床上治疗和预防以及诊治风湿性心脏病提供更为准确的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 4 月至 2014 年 6 月在本院接受治疗的 45 例风湿性心脏病患者为观察组以及本院体检中心的 45 例健康体检者为对照组作为本次的研究对象。其中观察组患者男 21 例、女 24 例, 患者年龄 21~37 岁, 平均(28.12 $\pm$ 2.12)岁, 对照组男 23 例、女 22 例, 患者年龄 20~35 岁, 平均(26.02 $\pm$ 1.89)岁。入选标准^[5]: (1)通过心脏彩超检查以及术后瓣膜病检测诊断为风湿性心脏病患者; (2)符合心脏病协会制定的心功能 II~IV 级标准。排除标准: (1)排除肝、肾功能不全的患者; (2)有冠心病、炎症性疾病以及急慢性感染患者。

作者简介:马星星, 男, 主治医师, 主要从事风湿性心脏瓣膜病的外科治疗、冠心病的外科治疗及研究。

(3)风湿性疾病近期有风湿活动的患者;(4)糖尿病、甲亢等内分泌疾病以及患者近期服用免疫功能调节的药物;(5)患有恶性肿瘤疾病的患者;(6)患有其他免疫性疾病的患者。整个研究均已得到患者知情同意并且患者签署知情同意书,并且通过本院伦理委员会批准进行,两组患者一般年龄、性别等一般资料无明显差异($P>0.05$),可进行对比分析。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪的检测 抽取受试者两管 5 mL 的静脉血作为本次的研究的标本,其中一支管置于温室下凝固 2 h 之后进行离心,对于 IL-6、IL-10、TGF- β 1 的血清浓度进行检测,采用的是酶联免疫吸附法(北京生化科技有限公司),在室温下将试剂盒从冰箱中取出静置 2 h,然后将试剂盒慢慢摇匀在缓缓打开试剂盒瓶盖,分别以 100 μ L 每孔将样品依次注入于酶标孔之中,最后将瓶盖盖上,在轻轻摇一摇,让样品与板底的抗体能够充分的接触,经过 2 h 的恒温处理之后,对 OD 值进行检测,最后计算出 IL-6、IL-10、TGF- β 1 的浓度,具体的操作方法严格按照试剂盒说明书进行;另一支管注入抗凝剂,然后将外周血中 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞进行常规分离,待细胞计数之后,将细胞浓度调整至 106/mL。提取出细胞悬液 100 μ L,在添加 20 μ L 的 CD25(上海研晶生物科技有限公司)和 CD4 抗体(上海恒远生物科技有限公司),在室内温度下进行避光反应,2 h 之后离心以上的混合液,最后采用流式细胞仪(生产厂家:长春市亚信生物科技电子有限公司)进行检测,分析 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞的百分比(以上所用荧

光抗体鼠抗人 CD4-FITC,CD25-APC,Treg-PE 单克隆抗体均购自 eBioscience 公司),使用交叉夹心 ELISA 方法对细胞的分泌抗体 Ig 类型进行检测,严格按照仪器说明书进行。

1.2.2 手术 将于患者的胸中骨正中切口,中低温体外循环,非患者的右房-房间隔径路现露出二尖瓣,选用 MIKI 法切除二尖瓣,最后采用连续缝合的方法植入。

1.2.3 细胞计数 将计数板以及盖片擦拭干净后将盖片置于计数板之上。然后再将细胞的悬液部分吸出,将其滴加于盖片的边缘,将悬液均匀充满于盖片与计数板之间,然后静置 3 min,需要注意盖片的下方不能有气泡,且需要注意悬液也不能流入到旁边的槽中。对板内的四大格细胞总数进行计算,其压线细胞计左侧与上方的格子中。然后进行推算,每毫升细胞总数=四大格的细胞总数/4 $\times$ 10⁴。

1.3 观察指标 观察两组受试者外周血 Treg 细胞的变化情况、血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 以及二尖瓣置换组织的 mR-NA 表达水平。

1.4 统计学处理 选择 SPSS18.0 进行数据统计,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 来表示,计量资料的比较采用 t 检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验,等级资料的比较采用秩和检验(Wilcoxon 两样本比较法)进行,当 $P<0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者外周血 Treg 细胞情况比较 观察组患者的 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞的比率均低于对照组患者($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者外周血 Treg 细胞的比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/淋巴细胞		<i>t</i>	<i>P</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg/CD4 ⁺ T 细胞		<i>t</i>	<i>P</i>
		治疗前	治疗后			治疗前	治疗后		
观察组	45	6.23 $\pm$ 1.78	3.21 $\pm$ 1.09	9.706	0.000	3.78 $\pm$ 0.45	1.02 $\pm$ 0.12	39.754	0.000
对照组	45	6.67 $\pm$ 2.09	4.78 $\pm$ 1.02	5.452	0.000	3.89 $\pm$ 0.56	2.12 $\pm$ 0.78	12.366	0.000
<i>t</i>		1.075	7.055			1.027	9.350		
<i>P</i>		0.285	0.000			0.307	0.000		

表 2 两组风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者血清 IL-6、IL-10、TGF- β 1 变化情况比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6		<i>t</i>	<i>P</i>	IL-10		<i>t</i>	<i>P</i>	TGF- β 1		<i>t</i>	<i>P</i>
		治疗前	治疗后			治疗前	治疗后			治疗前	治疗后		
观察组	45	24.53 $\pm$ 3.12	20.67 $\pm$ 4.01	5.096	0.000	16.78 $\pm$ 3.12	13.09 $\pm$ 2.07	6.611	0.000	34.09 $\pm$ 5.01	30.23 $\pm$ 6.31	3.214	0.002
对照组	45	25.45 $\pm$ 4.22	22.78 $\pm$ 5.09	2.709	0.008	17.09 $\pm$ 3.10	15.19 $\pm$ 2.09	3.409	0.001	35.78 $\pm$ 5.18	33.29 $\pm$ 7.03	1.913	0.059
<i>t</i>		1.176	2.184			0.473	2.840			1.573	2.173		
<i>P</i>		0.243	0.032			0.638	0.006			0.119	0.033		

表 3 两组风湿性心脏病二尖瓣置换组织的 mRNA 表达水平比较

组别	<i>n</i>	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
观察组	45	0.98 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.23	1.19 $\pm$ 0.31
对照组	45	0.48 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.13	0.78 $\pm$ 0.15
<i>t</i>		20.604	10.664	7.986
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

2.2 两组风湿性心脏病二尖瓣置换手术前后患者外周血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 变化情况比较 对两组患者的外周血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 采取的是血样离心后取血清酶联免疫吸附法检测患者血清浓度,根据表中数据显示的结果提示,观察组患者外周血清浓度 IL-6、IL-10、TGF- β 1 均低于对照组患者,两组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 两组风湿性心脏病二尖瓣置换组织的 mRNA 表达水平比较 两组患者的二尖瓣组织的 mRNA 表达水平对比使用的是 RT-PCR 技术检测患者的二尖瓣 MMP-2、MMP-9 和

TIMP-2 的表达情况。观察组患者的二尖瓣 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 表达水平显著高于对照组,两组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3 讨 论

临床研究表明,风湿性心脏病二尖瓣病变主要是由于体内的动力学障碍造成患者的左房、右室的压力和容量的负荷的显著升高,并且患者的心肌水平在过度拉伸刺激的作用下,激化患者体内的活化神经系统,最终产生 IL-6、IL-10、TGF- β 1 等因子^[6-8]。而且是人类自身免疫性疾病中最典型的,因为人体的心肌组织和溶血性链球菌表面的抗原极为的相似。并且二尖瓣置换手术中最为常规的手术模式就是低温、停跳以及体外循环,在围术期各种原因所激发的炎性介质释放以及系统性的炎性反应的发生都是引起患者心肌缺血重要原因。由此,减少手术中对患者心肌的损伤对疾病的预后以及治疗有着立竿见影的作用。心肌肌钙蛋白是心肌细胞特有的细胞收缩结构蛋白,当人体的心肌细胞受到损伤之后,将其置入血液循环之中,这是诊断手术中患者心肌损伤的敏感指标,对治疗风湿性心脏病有着重要的指导作用。

调节性 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞是人体机体维持免疫系统周围耐受的一个重要调控细胞^[9]。其在细胞的发育以及功能的发挥都有着重要的作用,有相关的研究证实,CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞的正常功能水平可以帮助于人体自身抗体构建良好的耐受能力,从而避免发生自身免疫疾病。本研究显示,患者的 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞降低,可以抑制自身免疫的作用相对减弱,从而导致患者引发了自身免疫性疾病。并且风湿性心脏病患者的病史一般都比较长,且病情总是反反复复的发生,着很有可能与患者体内的 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞以及 CD4⁺CD25⁺细胞/淋巴细胞有关,使得致病因子长期存在,并且有扩散的现象^[10-12]。而自身抗体长期供给瓣膜,免疫炎性的长期存在导致瓣膜挛缩或者是增长,从而导致严重的心脏瓣膜病变。

IL-6 和 IL-10 是一种抗炎因子,可以对单核细胞进行有效的抑制,进入人体的免疫功能。在本次的研究结果中显示风湿性心脏病患者外周血 IL-6 和 IL-10 的浓度均低于健康患者,由此可以表明,患者的心脏瓣膜是出现自身免疫性的炎症时,由于 IL-6 和 IL-10 的下降,可能会人体内的各种自身抗体以及其他炎症因子合成的概率会上升;TGF- β 1 是由人体内的血小板、单核细胞以及淋巴细胞分泌合成的,可以抑制 T 细胞的分化和活性免疫细胞的增殖,并且还可以帮助纤维细胞以及骨细胞生长^[13-15]。本次的试验结果显示,风湿性心脏病患者的 TGF- β 1 明显低于健康人体,表明血清中 TGF- β 1 的变化与人体瓣膜的病变起着重要作用。患者的 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 表达下降,提示 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 的动态失衡也是二尖瓣纤维的主要分子机制;在本次的实验中证明,MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 的动态平衡可能起着阻断和预防风湿性心脏病的二尖瓣纤维化,最后导致二尖瓣口狭窄的发生和发展得到预防和延迟。

综上所述,风湿性心脏病患者外周血中 Treg 细胞的变化以及 IL-6、IL-10 和 TGF- β 1 的浓度变化有着显著的关系。表明 IL-6、IL-10 和 TGF- β 1 浓度变化可以作为治疗风湿性心脏

病患者的指标。

参考文献

- [1] 孟涛,张心雨,李兴华,等. 吗啡和芬太尼对心内直视手术患者全身炎症反应和心脏功能影响的比较[J]. 山东大学学报(医学版),2011,49(2):102-105.
- [2] 徐枫,杨承祥,仲吉英,等. 术前静脉注射帕瑞昔布钠对膝关节置换术患者 IL-6、IL-10、TNF- α 和 VCAM-1 的影响[J]. 广东医学,2011,32(6):791-793.
- [3] 李勇,魏继承,周述之,等. 七氟醚后处理对瓣膜置换术中血清肌钙蛋白 T 及 IL-6、IL-8 浓度的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2011,27(11):1072-1074.
- [4] Saxena A. Evaluation of Acquired Valvular Heart Disease by the Pediatrician: When to Follow, When to Refer for Intervention; Part I[J]. Indian J Pediatr, 2015, 82(11): 1033-1041.
- [5] 魏振琴,魏继承,李士林,等. 七氟醚缺血后处理对心脏瓣膜置换术中血清肌钙蛋白 T 和心肌细胞内活性氧簇的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2012,28(4):360-362.
- [6] 赵璞,何龙,李志松,等. 帕瑞昔布钠对老年膝关节置换术患者术后早期认知功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(19):4115-4117.
- [7] 汪莲开. 风湿性心脏病患者的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞及细胞因子的改变及意义[J]. 中国免疫学杂志,2015, 3(3):389-392.
- [8] 黄刚哲,金勇男. 风湿性心脏病患者瓣膜组织自身抗原变化与 IL-10、TGF- β 1 血清浓度变化之间的关系[J]. 中国免疫学杂志,2015,3(3):393-395.
- [9] 李大柱. 甲亢患者手术治疗前后血清 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志,2010,23(3):265-266.
- [10] Zhu D, Wu Z, van der Geest RJ, et al. Accuracy of late Gadolinium enhancement - magnetic resonance imaging in the measurement of left atrial substrate remodeling in patients with rheumatic mitral valve disease and persistent atrial fibrillation[J]. Int Heart J, 2015, 56(5):505-510.
- [11] 黄健文. 甲亢患者手术前后血清 TNF- α 和 IL-6 水平变化的临床观察[J]. 中国医学工程,2013,2(24):25-26.
- [12] 郭思佳,孙增涛,李月川,等. 补肺颗粒对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 及 TGF- β 1 水平的影响[J]. 时珍国医国药,2013,24(12):2933-2934.
- [13] Mirabel M, Tafflet M, Noël B, et al. Newly diagnosed rheumatic heart disease among indigenous populations in the Pacific[J]. Heart, 2015, 101(23):1901-1906.
- [14] 胡媛媛,吕洁萍,田首元,等. 七氟醚维持麻醉对心脏瓣膜置换术患者血清超敏肌钙蛋白 I、IL-6 和 TNF- α 的影响[J]. 山西医科大学学报,2014,45(4):325-328.
- [15] 陈斌,魏云海. 参麦注射液对瓣膜置换术患者血清 TnT 及 IL-6、IL-8 的影响[J]. 中华中医药学刊,2014,11(5): 2694-2696.